

血漿膵グルカゴンの Radioimmunoassay の基礎的検討と、 糖尿病ならびに肝障害に関連する臨床的・実験的研究

伊 東 義 智 鬼 原 彰

札幌医科大学内科学第1講座 (主任 和田教授)

Radioimmunoassay of Plasma Pancreatic Glucagon, and Clinical and Experimental Investigations on Subjects with Diabetes Mellitus and Liver Disorders

Yoshinori ITO and Akira KIHARA

Department of Internal Medicine (Section 1), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. T. Wada)

Summary

Basic radioimmunoassay studies of pancreatic glucagon in plasma were carried out and the assay system thus obtained was used for the determination of plasma glucagon concentration in subjects with diabetes mellitus and liver disorder clinically and experimentally.

The results obtained were as follows:

- 1) In order to obtain labelled glucagon with a minimal damaged fraction, it was noted that extremely mild labelling conditions were necessary.
- 2) Pure ^{125}I -glucagon which satisfactorily bound to glucagon antibodies (30 K, Unger's Foundation) were obtained by repurification using microfine silica (Quso G-32).
- 3) A sensitive and reproducible radioimmunoassay (RIA) system was thus established by use of polyethyleneglycol for the separation of antibody-bound hormone from the free hormone.
- 4) The RIA system was applied to the examination of plasma glucagon, and significant elevations in the fasting state and higher reactive responses after administration of arginine were observed in patients with diabetes mellitus and with liver disorder, compared with those in normal controls.
- 5) Animal experiments were, at the same time, carried out on streptozotocin induced diabetic rats and rats with liver damage induced by CCl_4 administration, and the same changes in plasma glucagon levels were found in these rats.

Discussions were made on the mechanism of the abnormally increased plasma glucagon levels in fasting state and the hyperresponsiveness to arginine in subjects with diabetes mellitus and liver disorder.

緒 言

グルカゴンの radioimmunoassay (RIA) は 1959 年 Unger ら¹⁾ によって初めて開発されたが、抗体産生の困難性や膵グルカゴンと腸管由来のグルカゴン様物質 (glucagon-like immunoreactivity: GLI) との交叉反応があるために膵グルカゴンのみを分別測定することが出来なかった。

しかしその後 GLI との交叉反応がほとんど認められない膵グルカゴン特異抗体が作製され^{2,3)}、本邦においても最近これらの抗体を用いて糖尿病をはじめ種々の病態における膵 α 細胞機能の問題が論ぜられるようになった。

グルカゴンの RIA は他のホルモンとは異り、実施上特

に困難性を伴うと言われていたが、著者らは前述の膵グルカゴン特異抗体を用いてグルカゴンの RIA 法を確立し、一次性糖尿病、および二次性糖尿病との間に密接な関係下にある肝疾患について、臨床的ならびに実験的に血中膵グルカゴン動態を追究した。

A. グルカゴンの radioimmunoassay に関する 基礎的研究

実 験 方 法

1. ^{125}I -標識グルカゴンの作製に関する検討

(1) グルカゴンの radioiodination

既報⁴⁾のごとく、Hunter らの chloramin T 法により

グルカゴンの ^{125}I による標識を行った。すなわち Fig. 1 に示すごとく、結晶ウシーブタ・グルカゴン (Eli Lilly Co.) 5 μg に標識用 $\text{Na } ^{125}\text{I}$ (Amersham Radiochemical Centre) 1 mCi を加え、直ちに chloramin T を添加して反応を開始し、一定時間後に sodium metabisulfite 60 μg で反応を止める。次いで 1% human albumin (Miles Lab., fraction V) 100 μl を加えて標識を終了する。この反応液を sephadex G-10 (1 \times 25 cm, Pharmacia Fine Chemicals Inc.) カラムで 0.2 M glycine buffer (pH 8.8) を用いて eluate し、1 ml ずつ分画した最初の放射性ピークを ^{125}I -グルカゴンとして用いた。

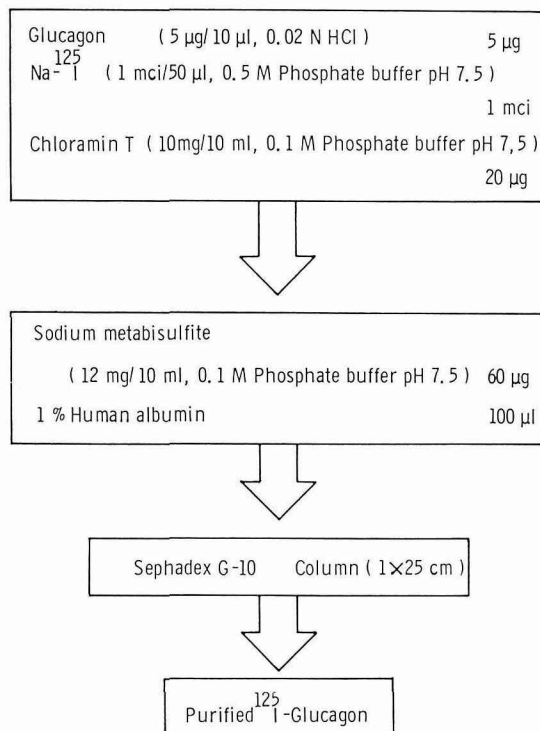


Fig. 1 Preparation of ^{125}I -labelled glucagon.

(2) Microfine silica (Quso G-32) による標識 グルカゴンの再精製

Sephadex G-10 カラムで分画した ^{125}I -グルカゴン中にはいわゆる damaged fraction が種々の比率で含まれていることから、これを除くために別報⁵⁾のごとく Holohan ら⁶⁾の microfine silica (Quso G-32, Dainabot Ltd.) を用いて ^{125}I -グルカゴンの再精製を行った。すなわち sephadex G-10 カラムで精製した ^{125}I -グルカゴン分画 1 ml に 0.2 M glycine buffer (pH 8.8) 3 ml を加え、次いで Quso G-32 を添加して十分に混和後、4°C, 3000 r.p.m. で 15 分間遠沈して上清をすてる。さらに同 buffer 2 ml

を加えて洗浄し、ethanol-0.5 N HCl を加えて ^{125}I -グルカゴンを抽出した。

(3) Hydrodynamic flow electrophoresis

得られた ^{125}I -グルカゴンの純度検定には Berson ら⁷⁾に従い hydrodynamic flow を行った。すなわち、Whatman 3 MM 濾紙を用い、Veronal buffer (pH 8.6, $\mu=0.075$) で約 1 時間泳動後濾紙を 1 cm の間隔で切断して γ -counter でその放射性を測定した。

以上各項の条件設定の過程については次の成績の項において述べる。

2. Polyethyleneglycol を用いる F/B 分離法・ その他の測定条件の検討

結合型グルカゴン (B) と遊離型グルカゴン (F) との分離法に関しては他のペプチド・ホルモンと同様に各種の方法が利用されているが、いずれも一長一短を示している。

今回著者らは F/B 分離法として Desbuquois ら⁸⁾の polyethyleneglycol (PEG) を用いる方法をグルカゴンの RIA に応用し、F/B 分離のための条件に関連してその基礎的な検討を行った。すなわち、0.2 M glycine buffer (pH 8.8, 0.25% human albumin, 1% normal sheep serum を含む) 0.1 ml, Trasylol 0.1 ml (1000 U, Bayer Ltd.), 標準グルカゴン溶液あるいは検体 (血漿) 0.1 ml, 膵グルカゴン抗体 0.1 ml (30 K, R. H. Unger's Lab., あるいは K 964, Novo Res. Ins.) および ^{125}I -グルカゴン 0.1 ml (2500~3000 c.p.m.: 25~30 pg) を加え、4°C で 72 時間反応させた。反応終了後総カウント (T) を測定し、次いで 5 倍稀釈血清 0.5 ml を加えて全量を 1.0 ml とする。これに 0.2 M glycine buffer (pH 8.8) で溶解した氷冷 25% PEG を加えて十分に混和する。30 分間氷水中に静置後 4°C で 3000 r.p.m., 30 分間遠沈し、上清を decantation によってすてた後、沈渣のカウント (B) を測定した。測定は自動 well 型 γ -counter で行った。

次いで 30 K 抗体あるいは K 964 抗体を用いて反応時間を検討し、その標準曲線を求めると共に、再現性・回収率についての基礎的吟味を施して最終的な RIA 法の設定をはかった。

実験成績

1. ^{125}I -標識グルカゴン作製の諸条件について

(1) Chloramin T 添加量の検討

比放射能の高い標識グルカゴンを得るためには chloramin T の添加量が大きく影響するところから、まずその検討を行った。

前述の方法により chloramin T をそれぞれ 10, 20,

40 μ g 添加して 20 秒間反応させ、sephadex G-10 カラムで分画後のピーク部分につき hydrodynamic flow を行った。

泳動後の damaged fraction の含有率をみると、Fig. 2 に示すごとく、chloramin T 10 μ g と 20 μ g では、それぞれ 30.0% および 28.3% と差異を認めないが、40 μ g 添加では 41.9% に増加を示した。このことは chloramin T 添加量が damaged fraction の含有率に明らかに影響することを示す。したがってその添加量は 20 μ g とした。

(2) Chloramin T との反応時間の検討

次いで chloramin T 20 μ g 添加時の反応時間 10, 20, 30 秒のそれぞれについて同様の検討を加えた。

Fig. 3 に示すごとく、反応時間の延長につれて damaged fraction の含有率はそれぞれ 14.2, 16.2, および 20.1% と次第に増加した。したがって反応時間は 15~20 秒の間にとどめることとした。これまでの段階における分画 125 I-グルカゴンの比放射能は 100~160 mCi/mg である。

(3) Quso G-32 による標識グルカゴンの再精製に関する検討

前述のごとく、sephadex G-10 カラムを用いる精製法のみでは、得られた 125 I-グルカゴン中にかなりの割合で damaged fraction が含まれることがさげられないため、Quso G-32 による再精製を試みた。

Fig. 4 は、(a) 再精製前、(b) Quso G-32 を加えて遠沈

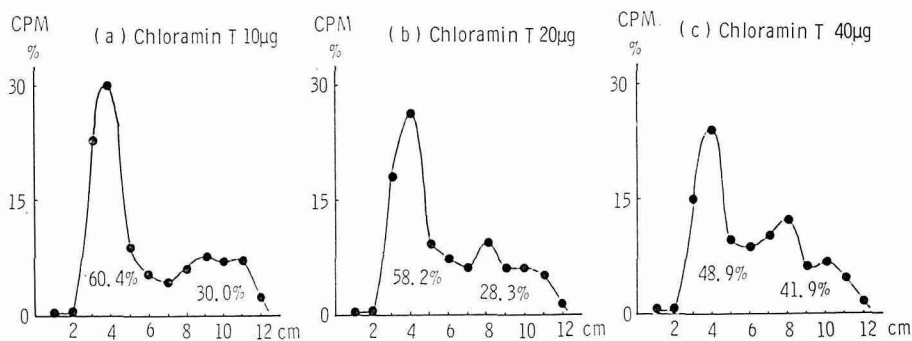


Fig. 2 Effect of chloramin T concentration on patterns of hydrodynamic electrophoresis of 125 I-glucagon.

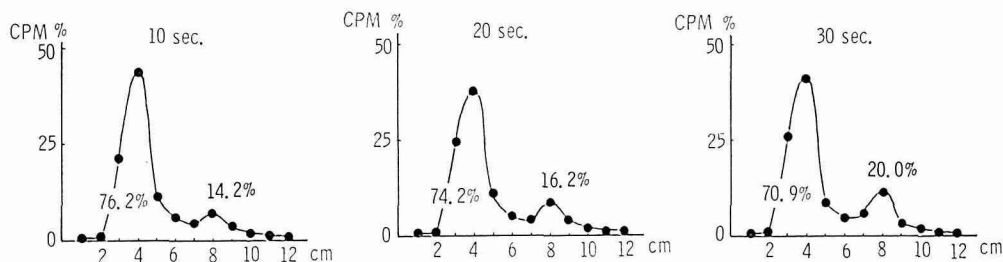


Fig. 3 Effect of incubation time with chloramin T on patterns of hydrodynamic electrophoresis of 125 I-glucagon.

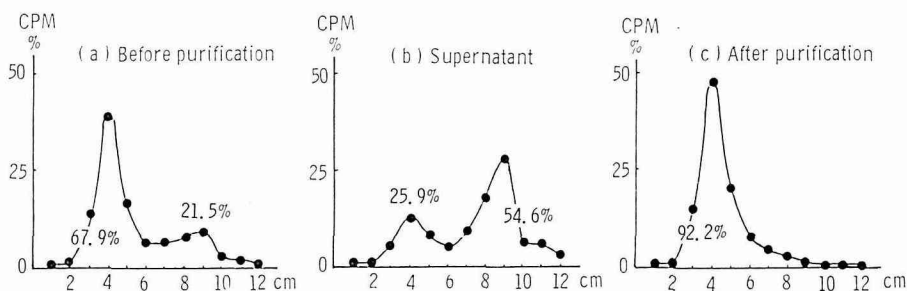


Fig. 4 Patterns of hydrodynamic electrophoresis of 125 I-glucagon before and after repurification by Quso G-32.

後の上清, (c) ethanol-HCl で抽出した ^{125}I -グルカゴンの hydrodynamic flow の成績をそれぞれ示した。すなわち, damaged fraction は Quso G-32 の吸着をうけることが少ないため上清に残り, ethanol-HCl で抽出後の ^{125}I -グルカゴンに含まれる damaged fraction の比率は常に数%以内に限定されることが明らかにされ, したがって本法の再精製への応用は極めて効果的と考えた。

(4) Quso G-32 による再精製条件に関する検討

Quso G-32 を用いる再精製法が intact な ^{125}I -グルカゴンを得る方法として有効であることが判明したので, 以下再精製のための諸条件について検討を行った。

まず Quso G-32 添加時の温度条件の上では室温と氷冷下で差異を認めず, 吸着時間も 1~30 分間でその吸着率に変化を認めなかった。Quso G-32 の添加量は 5, 10, 20 mg でみると, 添加量増加と共にその吸着率も上昇した。

Quso G-32 への吸着には蛋白濃度が強い影響を与えることから, 蛋白(血漿)を添加してその影響をみると, 添加する血漿の最終濃度が増すにつれて吸着率は次第に減少した。蛋白を含めぬ 0.2 M glycine buffer (pH 8.8) のみでは 80% 程度の吸着率を示した。Quso G-32 からの ^{125}I -グルカゴンの抽出には ethanol-HCl を用いたが, これにより 80~90% の ^{125}I -グルカゴンが抽出された。このさい ethanol-HCl の容量比を 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 と変化させても, また HCl 濃度を 0.05~1.00 N の範囲内で変化させても抽出率の変化は認めなかった。

以上の点から再精製操作は一応低温下(今回は 4°C)で行い, Quso G-32 の添加量は 20 mg とした。またその抽出には ethanol-0.5 N HCl (3:1, v/v) を用いた。本法による ^{125}I -グルカゴンの最終回収率は damaged fraction の比率にもよるが約 50% と良好であり, RIA 用として純度の高い標識グルカゴンを得ることが出来た。

2. PEG による F/B 分離法・その他測定上の反応諸条件について

(1) F/B 分離の条件について

本反応系において PEG による F/B 分離の最適の条件を得るために, 次の諸点について検討した。この場合の膵グルカゴン抗体としては 30 K を用いて実験を進めた。

a) PEG 濃度の影響: PEG の最終濃度 2.5~25.0% の範囲で検討した。Fig. 5 に示すごとく, PEG の最終濃度を増すにつれて B/T% は次第に増加はするが ($B_0\%$ は標準グルカゴン 0 pg を意味する), この場合 PEG による粘稠度も増加し, かつ抗体を加えない非特異結合も大きくなることから, 25% 前後(最終濃度で 12.5% 前後)の PEG を用いることが適当と考えられた。

b) PEG との反応時間および温度の影響: PEG 添加後 5~60 分間にわたり, 冷浴中および 20°C で B/T% の変化を検討した。

Fig. 6 に示すごとく, 抗体を加えない非特異反応は, 冷浴中あるいは 20°C 中, いずれも 5~60 分の間で B/T% は 5~7% とほぼ一定値を示した。一方 $B_0\%$ も冷浴中では時間経過と共にわずかに上昇するが, 20°C では 15 分を過ぎると $B_0\%$ は次第に低下した。したがって PEG と抗体結合 ^{125}I -グルカゴンとの反応は極めて短時間内に完了するものと考えられるが, 反応時間は一応 30 分間と定めた。PEG 操作は 20°C では時間の経過と共に B/T% の低下が起るから, 常に低温下で実施する必要がある。

c) 血清または γ -globulin 添加の影響: PEG により抗体結合 ^{125}I -グルカゴンを沈殿させるためには γ -globulin (γ -G) の存在が必要である⁸⁾。したがって血清あるいは γ -G の添加が ^{125}I -グルカゴンの沈殿にどのように影響するか

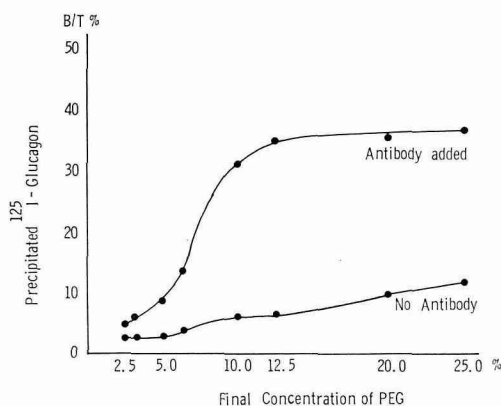


Fig. 5 Effect of PEG concentration on ^{125}I -glucagon precipitation.

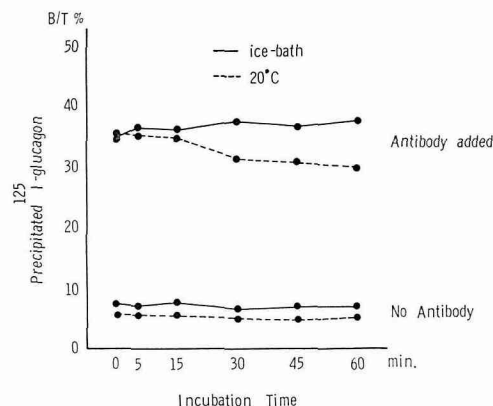


Fig. 6 Effect of temperature and incubation time on ^{125}I -glucagon precipitation by PEG.

を検討した。

Fig. 7 に示すごとく, bovine γ -G では 2.5~3.0 mg/tube (2 ml) の添加により $B_0\%$ と非特異結合との差は最大に達した。一方ヒト・プール血清を用いる時は, 0.2~0.3 ml/tube (2 ml) の添加でその差は最大となった。したがって今回の測定系では検体(血漿) 0.1 ml に対して, 第1反応終了後にヒト・プール血清 0.1 ml (5倍稀釈として 0.5 ml) を加えることにより, 全体として 0.2 ml の血清が含まれる様に設定した。

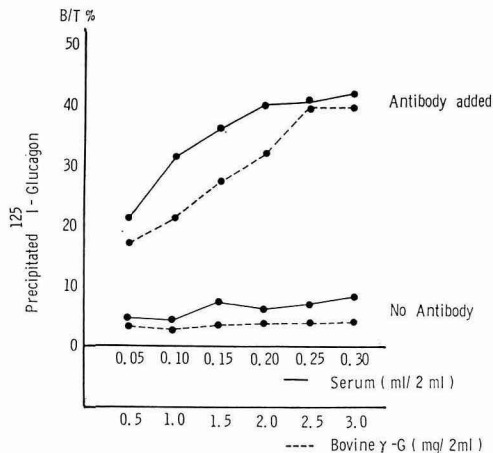


Fig. 7 Effect of protein concentration on ^{125}I -glucagon precipitation by PEG.

d) pH の影響: PEG を 0.2 M glycine buffer に溶解した後 pH を 6.8~9.8 となるように調整して pH の影響を観察したが, この範囲内においては非特異結合および $B_0\%$ はほぼ一定で変化は認められなかった。したがって PEG は 0.2 M glycine buffer (pH 8.8) に溶解して用いることとした。

e) 遠沈時間とその温度の影響: 4°C で遠沈操作を行うと, その $B_0\%$ はほとんど変化を示さず安定であったが, 20°C でこれを行うと, 時には $B_0\%$ の低下が認められた。また遠沈時間は 3000 r.p.m. で 30~40 分間行うことにより沈殿は強固となり, decantation しても支障のない状態を示した。

(2) 第1反応時間について

^{125}I -グルカゴンと 30 K 抗体 (最終濃度 1:40,000) との反応時間を検討した。

Fig. 8 に示すごとく, 抗体を加えない非特異結合は 24~120 時間目までにわずかに上昇を示したが, 抗体を加えたものでは標準グルカゴンが 0 pg/ml (B_0) および 400 pg/ml のいずれの場合にも 72~96 時間でほぼ plateau に達した。したがって第1反応時間は 72 時間と定めた。この点

については K 964 抗体を用いた検討でも同様の成績が得られた。

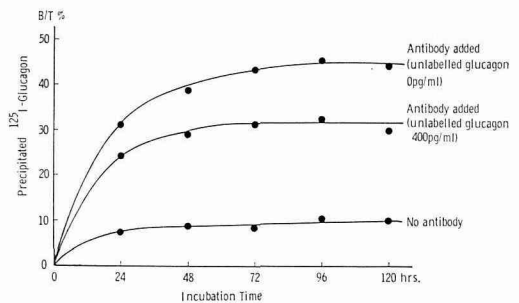


Fig. 8 Effect of first incubation time on ^{125}I -glucagon precipitation.

(3) 標準曲線について

Fig. 9 に 30 K 抗体 (1:40,000) を用いて作製した標準曲線を示したが, 標準グルカゴン濃度 50~1,600 pg/ml の間で良好な直線関係が得られ, 測定下界は 25 pg/ml であった。また K 964 抗体 (1:10,000) についてもほぼ同様の結果が得られた。

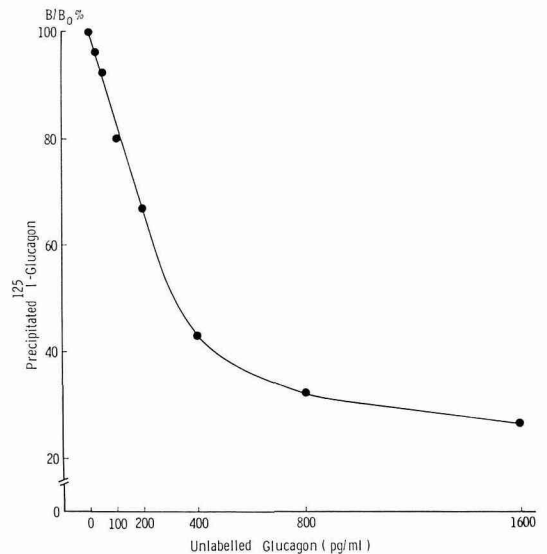


Fig. 9 Standard curve for glucagon immunoassay.

(4) 再現性について

グルカゴン濃度の異なる 4 種類の血漿サンプルについて同一測定系内における変動を検討したが, Table 1 (a) に示すごとく 30 K 抗体を用いた場合の $B/B_0\%$ の変動係数は 5% 以下と良好であり, K 964 抗体でも全く同様の結果が得られた。

次に別の4種類の血漿サンプルについて連続して3回測定を行い、測定系間の差異・変動を検討した。Table 1 (b) に示すごとく、この場合の変動係数は7.1~21.1%を示した。

Table 1 Reproducibility of the assay when applied to plasma

(a) Reproducibility of intraassays

Sample	No.	B/B ₀ % (M±S.D.)	C.V. (%)
A	5	87.6±2.9	3.3
B	5	83.1±3.1	3.7
C	5	54.5±2.1	3.9
D	5	48.6±1.3	2.7

(b) Reproducibility of interassays

Sample	No.	pg/ml (M±S.D.)	C.V. (%)
a	3	112±8	7.1
b	3	128±27	21.1
c	3	148±28	18.9
d	3	190±30	15.8

C.V.: coefficient of variation

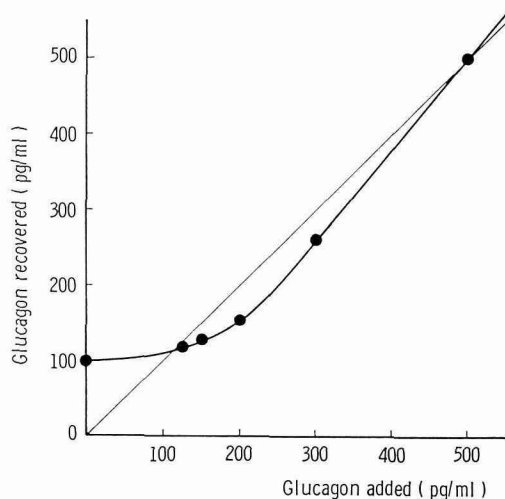


Fig. 10 Recovery of unlabelled glucagon added to plasma.

(5) 回収率について

Fig. 10 に示すごとく、回収試験では添加する標準グルカゴンを25, 50, 100, 200, 400 pg/ml とした時の回収率はそれぞれ96.0, 86.7, 80.0, 86.7 および100.0%を示し、500

pg/ml 以下のグルカゴン濃度では実測値は理論値よりもやや低値を示した。一方500 pg/ml 以上では逆に高値を示す傾向が認められたが、通常の測定においては十分満足出来る結果と考えられた。

(6) 膵グルカゴン抗体 30 K と K 964 の抗体力価の比較

それぞれの抗体の最終濃度を1:10,000として標準曲線を作製した。その結果 Fig. 11 に示すごとく、30 K 抗体は K 964 抗体に比較してかなりの高力価(約4倍)を有することが明らかとなったので、以下の臨床および動物実験においては30 K 抗体を用いることとした。

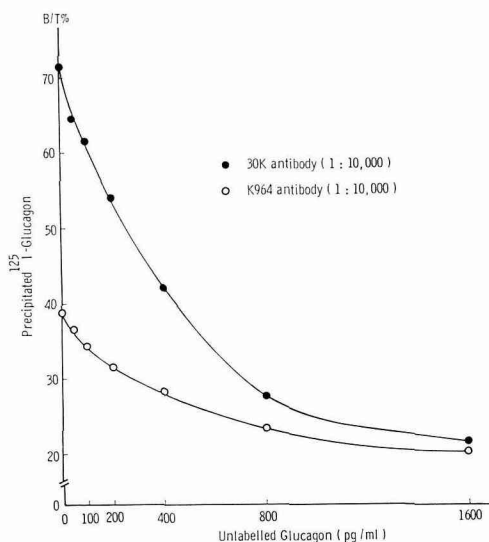


Fig. 11 Comparison of glucagon standard curve by means of 30 K antibody with that of K 964 antibody.

B. 臨床および実験的研究

前述のRIA法を利用して、臨床的には最近グルカゴンの分泌異常が注目されている一次性糖尿病患者と、二次性糖尿病を頻発する肝疾患患者をえらび、その血漿グルカゴン (immunoreactive glucagon: IRG) 動態を観察した。さらに動物実験的には streptozotocin 糖尿病ラットと CCl₄ 肝障害ラットを作製し、その血中 IRG の変動につき検討を加えた。

実験方法

1. 臨床実験

(1) 対象

症例は一次性糖尿病患者104名(男51名, 女53名, 年齢19~85歳, 平均55.2歳)で、治療内容別には食餌ないし経口糖尿病剤による治療群79名, インスリン治療群25名

である。肝疾患患者は55名(男45名,女10名,年齢19~65歳,平均40.8歳)で,病態別には肝硬変症14名,慢性肝炎28名,急性肝炎8名および脂肪肝5名である。これに正常対照群20名(男13名,女7名,年齢25~76歳,平均43.2歳)を設けた。

(2) 測定法

a) 血漿採取法: 早朝空腹時に血液1mℓ当り Trasylol 500 U, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) 1.2mgを含む試験管に採血して十分に混和後,すみやかに4°Cで血漿を遠心分離して測定時まで-20°Cで凍結保存した。なお測定は2カ月以内に行った。

b) アルギニン負荷試験: 糖尿病10名,肝疾患8名(慢性肝炎9名,脂肪肝1名)および対照8名を選んでアルギニン負荷試験を行った。

アルギニン(10%塩酸塩300mℓ,栄研化学)は早朝空腹時に30分間かけて点滴静注し,開始前,開始後10,20,30,40,50,60分目に対側の肘静脈より採血し,前述のごとく血漿を得て測定に供した。

c) 血糖測定: 血糖はO-toluidine 硼酸法⁹⁾により測定した。

2. 動物実験

(1) Streptozotocin 糖尿病ラットの作製

Junodら¹⁰⁾に従い,streptozotocin(STZ,Upjohn Lab.)を用いてラットに実験糖尿病発起をはかった。すなわちウイスター系雄ラット(体重300~350g)に頸静脈よりSTZ 55mg/kgを注射し,7~10日目に尿糖が陽性であることを確認した上で実験に供した。

(2) CCl₄ 肝障害ラットの作製

ウイスター系雄ラット(体重150~200g)を用い,CCl₄をオリーブ油に等量混合したものを2mℓ/kgずつ週2回,約2.5カ月間,計20回にわたって皮下注射した。対照ラットにはオリーブ油1mℓ/kgのみを同様に皮下注射した。

(3) アルギニン負荷試験

前述の処置ラットを16時間絶食後ウレタン(0.5g/kg)麻酔を施し,アルギニン400mg/kgを頸静脈より注射して対側頸静脈より注射前,注射後1,3,5分目に採血し,血漿試料を得た。

実験成績

1. 糖尿病について

(1) 臨床実験

a) 糖尿病患者の空腹時IRGについて: Table 2に示すごとく,糖尿病群の空腹時IRGは137±49pg/mℓと対照群の77±29pg/mℓに比べて有意の上昇(p<0.001)を示

Table 2 Fasting blood sugar and plasma glucagon levels in patients with diabetes mellitus and in normal controls (M±S.D.)

Subjects	(No.)	mean age (yrs.)	FBS (mg/100mℓ)	IRG (pg/mℓ)
Normal control	(20)	43.2 (25-76)	89±10	77±29
Diabetes mellitus	(104)	55.2 (19-85)	145±57*	137±49*
FBS≤100 mg	(19)		94±6	119±36*
100 mg<FBS≤150 mg	(58)		127±15*	138±49*
FBS>150 mg	(27)		217±66*	148±57*

FBS: fasting blood sugar

IRG: immunoreactive glucagon

Asterisks show a significant difference from control. * p<0.001

した。このさいの血糖値は対照群89±10mg/100mℓに比べ,糖尿病群は145±57mg/100mℓと高く,この間にも有意の差異(p<0.001)が認められた。

そこで糖尿病群をその空腹時血糖(fasting blood sugar: FBS)を指標として,FBS≤100mg群,100mg<FBS≤150mg群およびFBS>150mg群に分けてそのIRGを観察すると,それぞれ119±36pg/mℓ,138±49pg/mℓ,148±57pg/mℓと血糖値の上昇に平行してIRGの上昇が認められ,特に血糖値が対照群と差異のみられないFBS≤

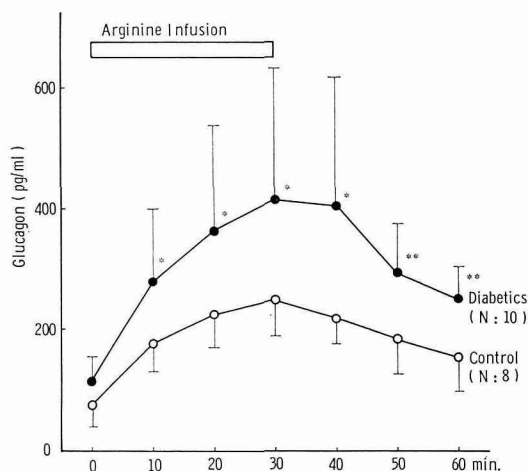


Fig. 12 Changes of plasma glucagon during and after arginine infusion in patients with diabetes mellitus and in normal controls (M±S.D.). Asterisks show a significant difference from control. * p<0.05 ** p<0.01

100 mg 群においても血中 IRG は有意の上昇 ($p < 0.001$) が認められた。

b) 糖尿病患者におけるアルギニン負荷による IRG の変動: Fig. 12 に示すごとく, 糖尿病群の血中 IRG はアルギニン負荷前 114 ± 41 pg/ml に対し, 負荷後は 10 分目から急速に上昇して 30 分目には 415 ± 226 pg/ml と最高値に達した。一方対照群の IRG は負荷前 76 ± 34 pg/ml に対し, 負荷後は同様に 10 分目から上昇して, 30 分目に最高値 250 ± 62 pg/ml を示した。両群の血中 IRG を比較すると, アルギニン負荷前にも糖尿病群では上昇傾向を示すが, 負荷後にはすべての時点で対照群に比べて有意の上昇を示した。

(2) 動物実験

以上の結果を STZ 糖尿病ラットについて検討した。

a) STZ 処置ラットの空腹時 IRG について: Table 3 に示すごとく, STZ 群の空腹時 IRG は 105 ± 33 pg/ml と対照群での 123 ± 37 pg/ml に比べて有意の差異を認めなかった。このさいの血糖値は STZ 群においては 291 ± 62 mg/100 ml と対照群の 186 ± 24 mg/100 ml に比べて有意の上昇 ($p < 0.001$) を示した。STZ 群を血糖値 250 mg 未満群と 250 mg 以上群に分けて比較したが, 両群の空腹時 IRG には差異を認めず, むしろ高血糖群で IRG は低下傾向を示した。

Table 3 Fasting blood sugar and plasma glucagon levels in streptozotocin induced diabetic rats and in control rats ($M \pm S.D.$)

Subjects	(No.)	FBS (mg/100 ml)	IRG (pg/ml)
Control rat	(11)	186 ± 24	123 ± 37
Diabetic rat	(12)	$291 \pm 62^*$	105 ± 33
FBS < 250 mg	(4)	$235 \pm 12^*$	125 ± 20
FBS \geq 250 mg	(8)	$320 \pm 57^*$	95 ± 35

FBS: fasting blood sugar

IRG: immunoreactive glucagon

Asterisks show a significant difference from control * $p < 0.001$

b) STZ 処置ラットにおけるアルギニン負荷による IRG の変動: Fig. 13 に示すごとく, STZ 群の IRG はアルギニン負荷前 128 ± 62 pg/ml に対して負荷後は 1 分目から急速に上昇し, 3 分目に最高値 611 ± 463 pg/ml を示した。一方対照群では負荷前 119 ± 46 pg/ml に対し, 負荷後は同様に 3 分目に最高値 321 ± 101 pg/ml を示した。両群の IRG を比較すると, STZ 群ではこの場合において

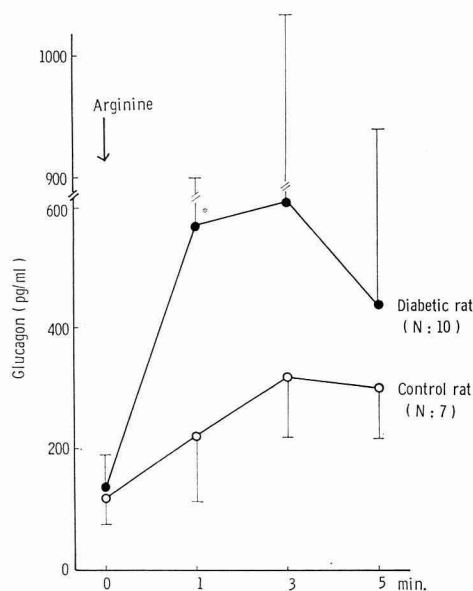


Fig. 13 Changes of plasma glucagon after arginine administration in streptozotocin induced diabetic rats and in control rats ($M \pm S.D.$). Asterisks show a significant difference from control. * $P < 0.01$

も負荷前の IRG は対照群のそれとの間に有意の差異を認めなかった。しかし負荷後に急速に上昇した IRG については, 1 分目においてすでに有意の差異 ($p < 0.01$) を示した。すなわち STZ 群ではアルギニン刺激に対して血中 IRG は過剰反応を示した。

2. 肝障害について

(1) 臨床実験

a) 肝疾患患者の空腹時 IRG について: Table 4 に示すごとく, 肝疾患群の空腹時 IRG は 141 ± 94 pg/ml と対照群の 77 ± 29 pg/ml に比べて有意の上昇 ($p < 0.001$) を示した。このさいの血糖値も肝疾患群においては 102 ± 33 mg/100 ml で, 対照群の 89 ± 10 mg/100 ml に比べて有意の上昇 ($p < 0.01$) を認めた。

これを病態別にみると, 急性肝炎 100 ± 35 pg/ml, 慢性肝炎 130 ± 63 pg/ml, 脂肪肝 135 ± 46 pg/ml, 肝硬変 190 ± 152 pg/ml を示し, 急性肝炎では対照群に比較してやや上昇傾向を示すに止まるが, 慢性肝炎, 脂肪肝および肝硬変ではいずれも対照群との間に有意の上昇 (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.01$ および $p < 0.01$) を示した。一方血糖値は肝硬変で最も高値を示す傾向が認められた。

b) 肝疾患患者におけるアルギニン負荷による IRG の変動: Fig. 14 に示すごとく, 肝疾患群の IRG はアルギ

ニン負荷前 138 ± 97 pg/ml に対し、負荷後は 10 分 383 ± 125 pg/ml, 20 分 508 ± 186 pg/ml, 30 分 543 ± 182 pg/ml, 40 分 443 ± 252 pg/ml, 50 分 351 ± 260 pg/ml, 60 分 271 ± 180 pg/ml と著明な上昇を示し、対照群に比べて 10~40 分目の間ではいずれにも有意の差で上昇が認められた。

(2) 動物実験

a) CCl_4 処置ラットの空腹時 IRG について: Table 5

Table 4 Fasting blood sugar and plasma glucagon levels in patients with liver disorder and in normal controls ($M \pm S.D.$)

Subjects	(No.)	mean age (yrs.)	FBS (mg/ 100 ml)	IRG (pg/ml)
Normal control	(20)	43.2 (25-76)	89 ± 10	77 ± 29
Liver disorder	(55)	40.8 (19-65)	$102 \pm 33^*$	$141 \pm 94^{**}$
Acute hepatitis	(8)		97 ± 21	100 ± 35
Chronic hepatitis	(28)		96 ± 14	$130 \pm 63^{**}$
Fatty liver	(5)		91 ± 13	$135 \pm 46^*$
Liver cirrhosis	(14)		120 ± 60	$190 \pm 152^*$

FBS: fasting blood sugar

IRG: immunoreactive glucagon

Asterisks show a significant difference from control * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

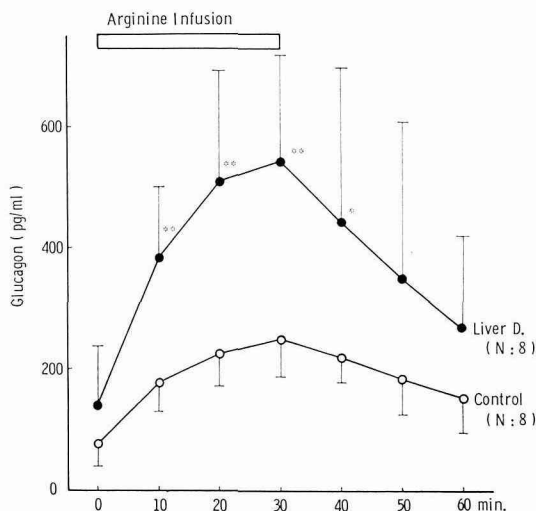


Fig. 14 Changes of plasma glucagon during and after arginine infusion in patients with liver disorder and in normal controls ($M \pm S.D.$).

Asterisks show a significant difference from control. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$

に示すごとく, CCl_4 肝障害群の空腹時 IRG は 449 ± 330 pg/ml と著明に上昇し、対照群の 220 ± 50 pg/ml に比べて有意の上昇 ($p < 0.005$) を示した。このさいの血糖値は CCl_4 群 118 ± 25 mg/100 ml, 対照群 124 ± 14 mg/100 ml と両群間には差異を認めなかった。

b) CCl_4 処置ラットにおけるアルギニン負荷による IRG の変動: Fig. 15 に示すごとく, CCl_4 肝障害群の IRG はアルギニン負荷前 212 ± 127 pg/ml に対し、負荷後は 1 分 655 ± 233 pg/ml, 3 分 573 ± 148 pg/ml, 5 分 593 ± 210 pg/ml と著明に上昇し、STZ 糖尿病ラットの場合とは異なり、1 分目に最高値を示した。一方対照群における IRG は負荷前 105 ± 26 pg/ml に対し、負荷後は 1 分 249 ± 99 pg/ml, 3 分 319 ± 117 pg/ml, 5 分 284 ± 80 pg/ml を示

Table 5 Fasting blood sugar and plasma glucagon levels in CCl_4 -treated rats and in control rats ($M \pm S.D.$)

Subjects	(No.)	FBS (mg/100 ml)	IRG (pg/ml)
Control rat	(18)	124 ± 14	200 ± 50
CCl_4 -treated rat	(19)	118 ± 25	$449 \pm 330^*$

FBS: fasting blood sugar

IRG: immunoreactive glucagon

Asterisks show a significant difference from control * $p < 0.005$

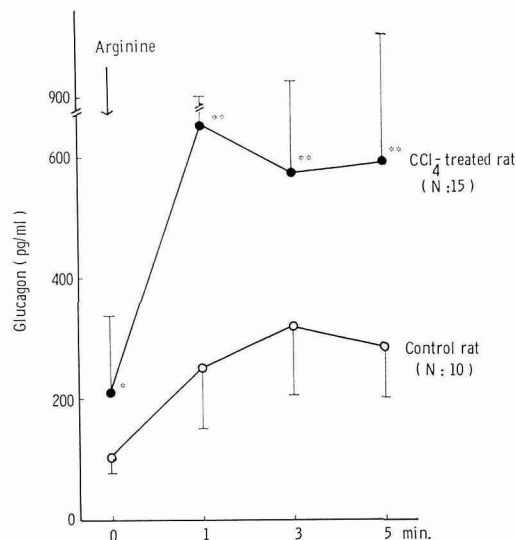


Fig. 15 Changes of plasma glucagon after arginine administration in CCl_4 -treated rats and in control rats ($M \pm S.D.$).

Asterisks show a significant difference from control. * $p < 0.05$ ** $p < 0.001$

し、3分目に最高値に達した。CCl₄群ではアルギニン負荷前における IRG は対照群に比べてすでに有意の上昇を示し、負荷後1~5分目のいずれの時点においても有意の上昇が認められた。

総括ならびに考按

以上において、まず血中膵グルカゴン測定のために問題となってきた RIA 法に関する基礎的な検討を加え、polyethyleneglycol を用いる1抗体法によるグルカゴンの RIA 法を確立した。

従来膵グルカゴンの血中濃度測定が困難であった理由としては、その抗体産生の困難性もさることながら、膵グルカゴンにのみ反応する特異抗体を得ることが容易でなかったことを第1に取り上げることが出来る。すでに血中にはグルカゴン抗体と交叉反応を有する腸管由来のグルカゴン (GLI) の存在が知られており^{2,3)}、そのために膵グルカゴンのみを分別測定することは不可能であった。この点については最近 Unger ら²⁾、Heding ら³⁾ が GLI とはほとんど反応しない膵特異抗体の作製に成功して以来、この抗血清の応用がほぼ問題を解決したとみることが出来る。

しかし血中グルカゴンの RIA による測定条件に関しては、なおこれまで重要な問題として標識グルカゴンの作製をはじめ多くの問題が残されて来た。すなわち、chloramin T による標識法を用いると、その酸化作用のために十分に比放射能が高く、かつ免疫活性を良好に保つ¹²⁵I-標識グルカゴンの作製は極めて困難であった。これまで標識ホルモンの純度を示す指標としては、Berson ら⁷⁾ によって考案された hydrodynamic electrophoresis を用いて、いわゆる damaged hormone の占める割合の少ないものを得る方法が試みられて来た。

これらの点から著者らはさきにもその一部の基礎的な検討結果を報告⁴⁾したが、まず chloramin T の添加量とその反応時間についての検討を行った結果、sephadex G-10 カラムで精製後の¹²⁵I-グルカゴン分画中に含まれる damaged fraction の比率は hydrodynamic flow 上では明らかに chloramin T 濃度に平行して増加し、40 μg 添加においては約40%の damaged fraction が検出された。このことは chloramin T 濃度を可能な限り少量にする必要性を示すものであるが、その結果は当然比放射能の低下をもたらすことになる。これらを勘案した本研究の結果において標識に用いる chloramin T 濃度は20 μg であることが望ましいと結論された。一方また chloramin T との反応時間についても時間の経過と共に damaged fraction の比率は増加することを明らかにし、30秒を越えることは望ましくないことから反応時間は15~20秒の間に一定

した。

以上の条件下に得られた¹²⁵I-グルカゴンの比放射能は100~160 mCi/mg とやや低値ではあるが、測定上には特別の支障を認めなかった。

しかしこの様に mild な標識条件を用いても毎回の標識時に生ずる damaged fraction の比率は必ずしも一定とはならず、さらにその純度を高める必要性が認められたので、Holohan ら⁶⁾ の microfine silica (Quso G-32) 法を応用して再精製を試み、その結果再精製後の damaged fraction の比率は常に数%以内に止めることが出来、かつ再精製操作によっても免疫活性には全く変化を認めなかった。この点から Quso G-32 による再精製法はグルカゴンの RIA 上極めて有用であることを明らかにして別に発表した⁵⁾。

ところで前述の damaged fraction の比率と標識のさいに起きる免疫活性の低下とはグルカゴン測定の際には関係がないとする島ら¹¹⁾の意見もあり、同時に免疫活性の低下は DMSO (dimethyl sulfoxide) を加えることによって防止し得ると述べているが、著者らの結果でも damaged fraction の比率と免疫活性がしばしば相関しないことをみているが、DMSO の添加は必ずしも島らの言うほどには良好な結果を示さなかった⁵⁾。この点は今後の研究課題であらう。

次に PEG を用いた F/B 分離法について検討した成績について考察を加える。

グルカゴンにおいても他のペプチド・ホルモンと同様に種々の F/B 分離法が試みられている。2抗体法^{12,13)}は結合型 (B) 分離法として最も代表的なものであり、インスリン等に多用されているが、グルカゴンは反応中に分解を受けやすいことが知られており¹⁴⁾、これは Trasylol を加えても完全には阻止出来ない。したがって反応時間の短縮に配慮しなければならないし、第2抗体が必要であることから実際的にはほとんど用いられていない。一方遊離型 (F) 分離法としては dextran-coated charcoal 法^{15,16)}、talc 法¹⁷⁾、cellulose 法¹⁸⁾等についての発表があり、それぞれに簡便で有用な利点があげられてはいるが、グルカゴンは標識時に免疫活性の低下する点がとくに問題で、そのために比放射能を高く出来ない事情下にある。したがって遊離型分離法を用いる時には必然的に総カウントを少なくする必要性が出て来る。またこれら吸着法の欠点として蛋白濃度の影響が大きいことも無視出来ない¹⁹⁾から、これらの点を考慮して本研究においては結合型分離法としての PEG 法について検討を加えた。

PEG はすでに血清蛋白分画法、なかでも γ-globulin 分画法の一つとして知られている。Harrington ら²⁰⁾は

これを抗原抗体複合物の沈降に用い、Desbuquois ら⁸⁾、Creighton ら²¹⁾によりペプチド・ホルモンのRIAに応用された。しかしPEGの蛋白沈殿作用の機序は明らかではなく、Kaldor ら²²⁾は蛋白結合水分子の除去、あるいはその配列変化が不溶化の理由であろうとしているが、蛋白の荷電状態やpHの影響も大きいとされている²³⁾。

PEGによる抗体結合¹²⁵I-グルカゴンの沈殿においてはcarrier proteinとして γ -Gの存在が必要である。今回の成績では血清0.2~0.3 mlの添加でB₀%と、非特異結合との差はほぼ一定となった。したがって検体として患者血漿0.1 mlを用いることから、第1反応終了後に5倍稀釈プール血清0.5 mlを加えることによって全体の血清量が0.2 mlとなるようにして測定を行った。またプール血清を加えることにより個々の血漿の質的内容、たとえば γ -G濃度等を一定にする効果もある。PEG濃度はその粘稠度を考慮して25% PEG溶液を用い、その上での吟味によって最終濃度12.5%となる様に用いることが最適と考えられた。この点については大根田ら²⁴⁾も同様の成績を報告している。

PEGと抗体結合¹²⁵I-グルカゴンの反応は瞬間的におきる様であるが、成績の安定を図るために反応時間を30分間とした。この操作は常に低温下で行うことが必要であり、室温20°CではB/T%の低下が認められた。また遠沈は3,000 r.p.m., 30~40分でその沈渣は強固となりdecantationが可能である。なおPEGの沈殿作用に対するpHの影響については0.2 M glycine buffer (pH 8.8)で溶解する限り分離能の低下は認められなかった。

以上の条件下に再現性を検討すると、同一測定系内での変動は極めて少なかったが、同一検体を連続3回測定すると、変動係数(C.V.)の上では最大20%程度の成績が得られた。また回収試験では添加標準グルカゴンが500 pg/ml以下の範囲では実測値は理論値よりもやや低値を示し、500 pg/ml以上では逆に高値を示した。しかし、一般には500 pg/ml以下の場合がほとんどであるから、これらの基礎吟味の結果を念頭にあれば十分満足し得るものと考えられた。この点についてはHenquin ら²⁵⁾も大体同様の結果を得ている。

以上のごとく、膵グルカゴンの1抗体法によるRIA法を吟味設定し、これを糖尿病および肝疾患について臨床的ならびに動物実験的に応用したので、得られた知見について考察を加えたい。

まず糖尿病患者104名について血中グルカゴン値を測定すると、早朝空腹時IRGは明らかに対照群よりも高値を示し、かつ血糖値の上昇に平行して血中IRGも上昇を示した。

糖尿病がインスリンの絶対的ないし相対的不足によって生ずる病態であることはすでに明らかにされているが、グルカゴンの測定が可能となるにつれてその役割がまた次第に重要性を増す段階にある。これまでは糖尿病の空腹時IRGが有意に上昇するとの報告^{26,27)}もみられる一方、対照との間に差異を認めないとするものや^{28,29)}、逆に減少傾向³⁰⁾を示すとするものがあって一定していない。しかし今回の著者らの検討結果からすれば、糖尿病では高血糖が存在するにもかかわらず血中IRGは上昇を示していた。この点から本病態を考えると、ブドウ糖によるグルカゴン分泌の抑制機序にも異常があるものと推論される。

一方これをアルギニン刺激によって検討すると、糖尿病ではIRGの過剰反応がみられた。すでにこのことは他にも報告^{28,31)}されていることであり、また糖尿病性アシドーシスのさいには著明な高IRG血症がみられるとされている³²⁾から、糖尿病ではグルカゴンの分泌亢進のあることは明らかである。

さらに今回は実験的にSTZ糖尿病ラットについてIRGを測定したが、空腹時IRGは対照ラットとの間に差異を認めず、その高血糖群ではむしろ血中IRGは減少傾向を示して臨床成績とは一致しなかった。しかしアルギニン刺激を施すと臨床実験同様にIRGの過剰分泌が観察された。

動物実験の上でAmherdt ら³³⁾は空腹時IRGに関しては重症ケト・アシドーシスを示す段階ではじめて血中IRGの上昇を認めたとしているから、臨床例とはその病態を異にするものとみるべきであろう。

以上を要約すると、糖尿病態においては、臨床的にも動物実験の上でも、高グルカゴン血症の存在することは明らかと言える。Unger ら³⁴⁾は糖尿病の成因としてbihormonal abnormality hypothesisを提唱し、インスリンとグルカゴンの相互関係の重要性を説いている。すなわちグルカゴンの存在なしには高血糖は起こらず、インスリン濃度との関係においてその程度が規定されようとしているが、いずれにしても一次性糖尿病における本ホルモンの役割・意義は極めて大きいものと考えられる。今回はその病態生理学的意義や本症の成因的役割についての詳細な検討は出来なかったが、その面にわたる解析を目的に臨床的ならびに動物実験的研究を継続中である。

次いで肝疾患患者においてはしばしば耐糖能異常がみられるところから、肝疾患におけるグルカゴンの血中動態を知ることは、肝性糖尿病の本態究明ばかりでなく、一次性糖尿病の病因を考える上にも有用と考えられる。その点から今回はまず臨床的に種々の肝疾患患者55名について空腹時血中IRGを測定したが、対照群に比べて有意の上昇を示し、このさいの血糖値にも軽度ではあるが有意の上昇

が認められた。さらに病態別にこれを見ると、急性肝炎では上昇傾向を示すに止まったが、慢性肝炎、脂肪肝および肝硬変症ではいずれも有意の差異を示し、中でも肝硬変症では最も高値を示した。

これをアルギニン刺激試験の上からみると、血中 IRG の上昇反応は対照群に比べて肝障害群の方がより著明であった。

一方ラットにおける CCl_4 肝障害実験によってこれを対比したが、空腹時 IRG は対照群に比べて有意の上昇を示し、血糖値には対照群に比較して著しい差異はみられなかった。アルギニン刺激反応の上からみても、肝障害群は負荷前においてすでに血中 IRG が対照群よりも有意の高値を示し、アルギニン負荷後には1分目から速やかに著明な上昇が認められた。

肝疾患時の血中グルカゴンの変動については、金山ら³⁵⁾、Marco ら³⁶⁾ は肝硬変症においてアルギニン負荷により血中 IRG が有意の上昇を示したと報告し、慢性肝炎³⁷⁾ でも同様の報告がみられている。今回の成績は一応空腹時 IRG のみについて調べたが、病態によってはなおかなり異った態度を示すことが推測される。

肝硬変症における血中 IRG の過剰反応の原因としては、肝実質細胞の機能低下や門脈大循環路の形成によるグルカゴン分解能の低下^{36,38)} が主要な原因と考えられているが、グルカゴン分泌をひき起こす作用をもつアミノ酸の血中上昇³⁸⁾、あるいは膵 α 細胞のブドウ糖利用障害³⁶⁾ 等も関係があらうと推論する向きがある。同時に肝疾患ではしばしば高インスリン血症もみられるが、これには肝におけるその分解能の低下ばかりではなく、膵 β 細胞の分泌亢進も原因の一つであらうとされており³⁹⁾、グルカゴンの場合にも何らかの機序でその分泌亢進が起こっている可能性を否定出来ないものとする。

今回はアルギニン刺激試験を各種の肝病態について実施するまでにいたらなかったが、この点に関しては今後の継続的な研究によってその機序の解明を期待したい。

なお肝性糖尿病でみられるインスリン抵抗性をめぐっては種々の抗インスリン因子が考えられているが、たとえば成長ホルモン、副腎皮質ならびに髄質ホルモンをはじめ多くのホルモンが抗インスリン作用を示すことはよく知られていることであり、中でもグルカゴンはその点で最も重要な役割を果たすものと推測されている。今回も高グルカゴン血症が糖代謝異常との間に密接に関係することが裏づけられたが、文献的にも耐糖能異常のみられる肝硬変症においてアルギニン刺激試験はより著明に血中 IRG の上昇反応を示すことが報告³⁵⁾ されており、教室における最近の知見⁴⁰⁾ でも各種肝疾患に対して経口的にブドウ糖負荷試

験を行うと、耐糖能異常群ほど明らかに高グルカゴン血症がみられているから、肝疾患における糖代謝異常とグルカゴン分泌異常とは密接な関係下にあるものと推測される。

結 論

膵グルカゴンの血中濃度測定とその病態生理学的意義を明らかにすべく、基礎的にその radioimmunoassay に関する基本条件の検討を行った。続いて確立された assay 系を応用して臨床的ならびに動物実験的に検討して、以下の結果を得た。

1. 血中 IRG 測定法の確立に関連してグルカゴン標識時の chloramin T 濃度とその反応時間を検討し、極めて mild な標識条件が必要であることを明らかにした。さらに microfine silica (Quso G-32) を用いて再精製を行うことにより純度の高い標識グルカゴンを効率的に得ることを明らかにした。

2. Polyethyleneglycol を用いる F/B 分離法についてその条件を検討し、再現性、回収率の上で共に満足出来る成績を得た。本法は簡便性、経済性のはかに反応時間短縮等の利点からグルカゴンの RIA 測定への応用価値が大きい。これらの知見を総合して血中グルカゴンの RIA 法を確立し、臨床的・動物実験の応用を試みた。

3. 本法の臨床応用によると糖尿病のさいにはその空腹時 IRG は有意の上昇を示し、アルギニン負荷により過剰反応を呈することを認めた。また streptozotocin 糖尿病ラットについて、これを見ると、空腹時 IRG は対照ラットとの間に差異を認めなかったが、アルギニン刺激では臨床実験と同様に有意の上昇反応を示した。

4. 肝疾患においてもその空腹時 IRG は有意の上昇を示し、アルギニン負荷では著明な高反応を認めた。 CCl_4 肝障害ラットの空腹時 IRG も対照ラットに比べて有意の高値を示し、アルギニン刺激により有意の上昇を認め、臨床成績との間に一致を示した。

5. 以上より、糖尿病では絶対的ないし相対的なグルカゴン分泌過剰状態の存在が推測され、またこの点は肝障害時においても同様であった。これらの現象については糖代謝異常ならびにそれに関連する種々の病態生理との間に密接な関係があるものと考え考察を加えた。

稿を終えるにあたりご懇篤なるご指導ご校閲を賜った和田武雄教授に深謝致しますと共に、種々ご教示ご助言をいただいた大原弘通助教授に感謝致します。

本研究の一部は文部省科学研究助成金(和田)の補助に負うた。

(昭和 51.9.7 受理)

文 献

- 1) Unger, R. H., Eisentraut, A. M., McCall, M. S., Keller, S., Lanz, H. C. and Madison, L. L.: Glucagon antibodies and their use for immunoassay of glucagon. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **102**, 621-623 (1959).
- 2) Eisentraut, A., Ohneda, A., Parada, E. and Unger, R. H.: Immunologic discrimination between pancreatic glucagon and enteric glucagon-like immunoreactivity (GLI) in tissues and plasma. *Diabetes* **17**, 321-322 (1968).
- 3) Heding, L. G.: Radioimmunological determination of pancreatic and gut glucagon in plasma. *Diabetologia* **7**, 10-19 (1971).
- 4) 伊東義智, 菊池 晃, 稲辺靖仁郎, 藪内信治, 鬼原 彰, 大原弘通: Polyethyleneglycol を用いた peptide hormone の radioimmunoassay に関する研究: 第2報 Glucagon について. *臨床病理* **23**, 811-814 (1975).
- 5) 伊東義智, 小笠原徹也, 鬼原 彰, 大原弘通: Micro-fine silica (Quso G-32) による標識グルカゴンの精製. *核医学*, **14**, 197-202 (1977).
- 6) Holohan, K. N., Murphy, R. F., Buchanan, K. D. and Elmore, D. T.: Enzymic iodination of polypeptide hormones for radioimmunoassay. *Clin. Chim. Acta* **45**, 153-157 (1973).
- 7) Berson, S. A., Yalow, R. S., Bauman, A., Rothschild, M. A. and Newerly, K.: Insulin- I^{131} metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J. Clin. Invest.* **35**, 170-190 (1956).
- 8) Desbuquois, B. and Aurbach, G. D.: Use of polyethyleneglycol to separate free and antibody-bound peptide hormone in radioimmunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33**, 732-738 (1971).
- 9) 佐々木禎一: O-Toluidine 硼酸法による血糖の迅速微量定量法. *臨床検査* **11**, 409-413 (1967).
- 10) Junod, A., Lambert, A. E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A. E. and Renold, A. E.: Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **126**, 201-205 (1967).
- 11) Shima, K., Sawazaki, N., Tanaka, R., Tarui, S. and Nishikawa, M.: Effect of an exposure to chloramin T on the immunoreactivity of glucagon. *Endocrinology* **96**, 1254-1260 (1975).
- 12) Harrzard, W. R., Crockford, P. M., Buchanan, K. D., Vance, J. E., Chen, R. and Williams, R. H.: A double immunoassay for glucagon. *Diabetes* **17**, 179-186 (1968).
- 13) Shima, K. and Foà, P. P.: A double antibody assay for glucagon. *Clin. Chim. Acta* **22**, 511-520 (1968).
- 14) Eisentraut, A., Whissen, N. and Unger, R. H.: Incubation damage in the radioimmunoassay for human plasma glucagon and its prevention with "Trasylol". *Am. J. Med. Sci.* **255**, 137-142 (1968).
- 15) Rocha, D. M., Faloona, G. R. and Unger, R. H.: Glucagon-stimulating activity of 20 amino acids in dogs. *J. Clin. Invest.* **51**, 2346-2351 (1972).
- 16) Weir, G. C., Turner, R. C. and Martin, D. B.: Glucagon radioimmunoassay using antiserum 30 K: interference by plasma. *Horm. Metab. Res.* **5**, 241-244 (1973).
- 17) 桜井英雄, 倉八博之, 井村裕夫: 豚グルカゴンのラジオイムノアッセイによる測定. *Diabetes Journal* **1**, 172-174 (1973).
- 18) 吉田隆司, 豊島博行, 野中共平, 垂井清一郎: 血漿グルカゴン測定における correction factor の導入: cellulose powder による glucagon free plasma の作製とその利用. *糖尿病* **18**, 156-163 (1975).
- 19) 鬼原 彰, 石橋文利, 伊東義智, 大原弘通: Dextran-coated charcoal 法による血中 glucagon の測定について. *臨床病理* **22**, 796-797 (1974).
- 20) Harrington, J. C., Fenton, J. W. and Pert, J. H.: Polymer-induced precipitation of antigen-antibody complexes: 'Precipiplex reaction' *Immunochemistry* **8**, 413-421 (1971).
- 21) Creighton, W. D., Lambert, P. H. and Miescher, P. A.: Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethyleneglycol. *J. Immunol.* **111**, 1219-1227 (1973).
- 22) Kaldor, G., Hsu, Q. S., Wachsberger, P. and Chowrashi, P.: Effect of polyethyleneglycol on contraction by various muscle models. *Am. J. Physiol.* **220**, 639-645 (1971).
- 23) Polson, A., Potgieter, G. M., Largier, J. F., Mears, G. E. F. and Joubert, E. J.: The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta* **82**, 463-475 (1964).
- 24) 大根田昭, 石井正二: ポリエチレングリコール法によるグルカゴンの radioimmunoassay. *糖尿病* **17**, 23-26 (1974).
- 25) Henquin, J. C., Malvaux, P. and Lambert, A. E.: Glucagon immunoassay using polyethyleneglycol to precipitate antibody-bound hormone. *Diabetologia* **10**, 61-68 (1974).
- 26) Heding, L. G. and Rasmussen, S. M.: Determi-

- nation of pancreatic and gut glucagon-like immunoreactivity in normal and diabetic subjects. *Diabetologia* **8**, 408-411 (1972).
- 27) Pek, S., Fajans, S. S., Floyd, J. C., Knope, R. F., Weissman, P. N. and Conn, J. W.: Plasma levels of glucagon in patients with diabetes mellitus. *Diabetes* **21** (suppl 1), p. 324 (1972).
 - 28) Unger, R. H., Aguilar-Parada, E., Müller, W. A. and Eisentraut, A. M.: Studies of pancreatic alpha cell function in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* **49**, 837-848 (1970).
 - 29) 倉八博之, 桜井英雄, 吉見輝也, 清野 裕: 糖尿病患者の 50 g ブドウ糖経口負荷時の膵グルカゴン反応について. *糖尿病* **18**, 499-504 (1975).
 - 30) Buchanan, K. D. and McCarroll, A. M.: Abnormalities of glucagon metabolism in untreated diabetes mellitus. *Lancet* **2**, 1394-1395 (1972).
 - 31) Ohneda, A., Ishii, S., Horigome, K. and Yamagata, S.: Glucagon response to arginine after treatment of diabetes mellitus. *Diabetes* **24**, 811-819 (1975).
 - 32) Müller, W. A., Faloona, G. R., Unger, R. H.: Hyperglucagonemia in diabetic ketoacidosis: its prevalence and significance. *Am. J. Med.* **54**, 52-57 (1973).
 - 33) Amherdt, M., Harris, V., Renold, A. E., Orci, L. and Unger, R. H.: Hepatic autophagy in uncontrolled experimental diabetes and its relationships to insulin and glucagon. *J. Clin. Invest.* **54**, 188-193 (1974).
 - 34) Unger, R. H. and Orci, L.: The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 14-16 (1975).
 - 35) 金山正明, 小泉精策, 坂本 龍, 是永正義, 中島公雄: 肝硬変症における膵グルカゴンの血中動態. *医学のあゆみ* **95**, 268-269 (1975).
 - 36) Marco, J., Diego, J., Villanueva, M. L., Diaz-Fierros, M., Valverde, I. and Segovia, J. M.: Elevated plasma glucagon levels in cirrhosis of the liver. *New Engl. J. Med.* **289**, 1107-1111 (1973).
 - 37) 清野 裕, 田港朝彦, 後藤康生, 倉八博之, 桜井英雄, 中根憲一, 池田正毅, 井村裕夫: 各種内分泌疾患, 肝疾患, 肥満症におけるアルギニン負荷時の膵グルカゴンならびにインスリン反応. *糖尿病* **18**, 121-127 (1975).
 - 38) Sherwin, R., Joshi, P., Hendler, R., Felig, P. and Conn, H. O.: Hyperglucagonemia in Laennec's cirrhosis: the role of portal-systemic shunting. *New Eng. J. Med.* **290**, 239-242 (1974).
 - 39) 小関亮一: 肝障害時における糖代謝異常について. *日内会誌* **64**, 317-327 (1975).
 - 40) 小笠原徹也, 太田英勝, 鬼原 彰, 大原弘通, 和田武雄: 二次性糖尿病の成因に関する研究: 第2報 肝疾患における糖代謝異常と insulin および glucagon 動態. *糖尿病* **19**, suppl., p. 96 (1976).